

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

N. Itoh et al.

7/11/03

Q76481

10f1

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 7月15日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-205207

[ST.10/C]:

[JP2002-205207]

出 願 人

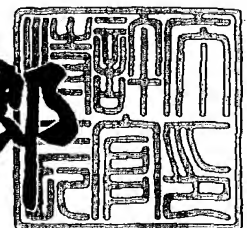
Applicant(s):

住友化学工業株式会社

2003年 3月28日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3021933

【書類名】 特許願
【整理番号】 P154630
【提出日】 平成14年 7月15日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12P 7/02
【発明者】

【住所又は居所】 富山県富山市文京町1-2-18

【氏名】 伊藤 伸哉

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

【氏名】 脇田 龍平

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100113000

【弁理士】

【氏名又は名称】 中山 亨

【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

【識別番号】 100119471

【弁理士】

【氏名又は名称】 榎本 雅之

【電話番号】 06-6220-3405

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0109029

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】

3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法であって、1, 3-シクロヘキサンジオンを、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した3-ヒドロキシシクロヘキサノン採取する工程を有することを特徴とする製造方法。

【請求項2】

3-ヒドロキシシクロヘキサノンが光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノンであることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項3】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が、前記能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項4】

形質転換体が、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有するプラスミドが導入されてなる形質転換体であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

【請求項5】

形質転換体が大腸菌であることを特徴とする請求項3又は4記載の製造方法。

【請求項6】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミ

ノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号2又は4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2又は4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項7】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項8】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

＜アミノ酸配列群＞

(a) 配列番号3で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) ペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項9】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項10】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項11】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請

求項1記載の製造方法。

【請求項12】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項13】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成させるための触媒としての、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の使用。

【請求項14】

3-ヒドロキシシクロヘキサノンが光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノンであることを特徴とする請求項13記載の使用。

【請求項15】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成させるための触媒としての、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞の使用。

【請求項16】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元能力する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の由来が、アルスロバクター属、ロドトルラ属、バシラス属、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、キャンデイダ属、コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項17】

形質転換体が、

下記の2つの人為的に付与される能力を同時に有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有する1つのプラスミド、

下記(i)の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA及び下記(ii)の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを同時に有する1つのプ

ラスミド、あるいは、

下記 (i) の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA を含有するプラスミド及び下記 (ii) の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA を有するプラスミドからなる 2 つのプラスミド、
 が少なくとも導入されてなる形質転換体であることを特徴とする請求項 3 記載の製造方法。

<人為的に付与される能力>

(i) 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力

(ii) 上記 (i) の能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力

【請求項 18】

補酵素が、 NADH/NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) もしくは $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸) であることを特徴とする請求項 17 記載の製造方法。

【請求項 19】

脂肪族アルコールの存在下、形質転換体又はその死菌化細胞に 1, 3-シクロヘキサンジオンを作用させることを特徴とする請求項 3 記載の製造方法。

【請求項 20】

脂肪族アルコールが 200°C 以下の沸点を持つアルコールであることを特徴とする請求項 19 記載の製造方法。

【請求項 21】

脂肪族アルコールが 2-プロパノールであることを特徴とする請求項 19 記載の製造方法。

【請求項 22】

グルコースの存在下、形質転換体又はその死菌化細胞に 1, 3-シクロヘキサンジオンを作用させることを特徴とする請求項 3 記載の製造方法。

【請求項 23】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

＜アミノ酸配列群＞

- (a) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列
- (b) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列
- (c) 配列番号2又は4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列
- (d) 配列番号2又は4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列
- (e) コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項 24】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

＜アミノ酸配列群＞

- (a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列
- (b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列
- (c) 配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項25】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号3で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) ペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項26】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

【請求項 27】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

【請求項 28】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

【請求項 29】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

【請求項 30】

光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法等に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

3-ヒドロキシシクロヘキサノンは、特開2001-29549等に記載されるように置換レゾルシノール誘導体の製造に有用な化合物である。

【0003】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法について鋭意検討した結果、1, 3-シクロヘキサンジオンを、当該化合物を還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した3-ヒドロキシシクロヘキサノンを採取することにより、目的とする3-ヒドロキシシクロヘキサノンを効率的又は簡便に製造できることを

見出し、本発明に至った。

【0004】

即ち、本発明は、

1. 3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法であって、1, 3-シクロヘキサンジオンを、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した3-ヒドロキシシクロヘキサノンを採取する工程を有することを特徴とする製造方法；
2. 3-ヒドロキシシクロヘキサノンが光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノンであることを特徴とする前項1記載の製造方法；
3. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が、前記能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞であることを特徴とする前項1記載の製造方法；
4. 形質転換体が、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有するプラスミドが導入されてなる形質転換体であることを特徴とする前項3記載の製造方法；
5. 形質転換体が大腸菌であることを特徴とする前項3又は4記載の製造方法；
6. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法

＜アミノ酸配列群＞

- (a) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列
- (b) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列
- (c) 配列番号2又は4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列
- (d) 配列番号2又は4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有す

るDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列
(e) コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列:

7. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法;

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列;

8. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号3で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配

列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) ペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列；

9. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

10. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

11. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

12. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力が、配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

13. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成させるための触媒としての、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の使用；

14. 3-ヒドロキシシクロヘキサノンが光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノンであることを特徴とする前項13記載の使用；

15. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成させるための触媒としての、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞の使用；

16. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元能力する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の由来が、アルスロバクター属、ロドトルラ属、バシラス属、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、キャンデイダ属、コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

17. 形質転換体が、

下記(1)の人為的に付与される能力を同時に有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有する1つのプラスミド、

下記(2)の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA及び下記(3)の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを同時に有する1つのプラスミド、あるいは、

下記(4)の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有するプラスミド及び下記(5)の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを有するプラスミドからなる2つのプラスミド、

が少なくとも導入されてなる形質転換体であることを特徴とする前項3記載の製造方法

<人為的に付与される能力>

(1) 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力

(2) 上記(1)の能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力；

18. 補酵素が、 NADH/NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) もしくは $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリオン酸) であることを特徴とする前項17記載の製造方法；

19. 脂肪族アルコールの存在下、形質転換体又はその死菌化細胞に1, 3-シ

クロヘキサンジオンを作用させることを特徴とする前項3記載の製造方法；

20. 脂肪族アルコールが200℃以下の沸点を持つアルコールであることを特徴とする前項19記載の製造方法；

21. 脂肪族アルコールが2-プロパノールであることを特徴とする前項19記載の製造方法；

22. グルコースの存在下、形質転換体又はその死菌化細胞に1, 3-シクロヘキサンジオンを作用させることを特徴とする前項3記載の製造方法；

23. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項3記載の製造方法

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号2又は4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2又は4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列；

24. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項3記載の製造方法

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号 2 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

25. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項 3 記載の製造方法；

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号 4 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) ペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

26. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項3記載の製造方法；

27. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項3記載の製造方法；

28. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項3記載の製造方法；

29. 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生成する能力が、配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項3記載の製造方法；

30. 光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン；

等を提供するものである。

【0005】

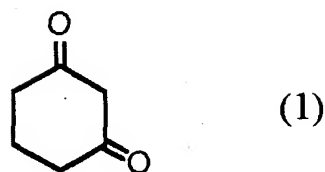
【発明の実施の形態】

【0006】

以下、本発明について詳細に説明する。

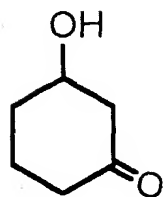
本発明における「1, 3-シクロヘキサンジオン」は、式(2)

【化1】



で示される化合物である。また「3-ヒドロキシシクロヘキサノン」は、式(2)

【化 2】



(2)

で示される化合物である。

本発明における「光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン」とは、上記の式 (2) においてヒドロキシ基が結合する炭素原子が光学活性炭素原子である対掌体（右旋性化合物又は左旋性化合物）のうち、一方の光学異性体が他方の光学異性体よりも高い割合で存在している化合物であって、例えば、当該割合が極端に高い化合物から 50% に近い化合物までを含む。尚、当該割合は使用目的等の種々の条件に応じて適宜決定されるが、一般的には、例えば 95%～100%、好ましくは 98%～100%、の高いものがよい。

本発明製造方法で用いられる酵素は、1, 3-シクロヘキサジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素である（以下、本還元酵素と記すこともある。）。このような酵素は、本還元酵素を産生する微生物等から通常の生化学的な手法や遺伝子工学的な手法等を利用して調製することができる。例えば、本還元酵素を産生する微生物が形質転換体である場合には、当該形質転換体としては、1, 3-シクロヘキサジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA を含有するプラスミドが少なくとも導入されてなる形質転換体（以下、本形質転換体と記すこともある。）等をあげることができる。また、本還元酵素を産生する微生物が非形質転換体（即ち、前記能力が人為的に付与されていないにも係わらず、予め当該能力を有する微生物）である場合には、当該非形質転換体としては、後述の実施例のように、市販の微生物又は土壌などから前記能力を指標にしてスクリーニングすることにより単離された微生物等があげられる。このような微生物の例

としては、アルスロバクター属、ロドトルラ属、バシラス属、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、キャンデイダ属、コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物等をあげることができる。さらに、本発明製造法で用いられる酵素は前記能力を指標にしてスクリーニングすることにより選ばれる市販の酵素であってもよい。用いられる酵素の例としては、KRED1001、KRED1002、KRED1003、KRED1004、KRED1005、KRED1006、KRED1007、KRED1008（いずれもバイオキャタリティックス社製品）のような市販の酵素をあげることができる。

【0007】

一方、本発明製造方法で用いられる形質転換体が、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力及び該能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力を人為的に付与されてなる形質転換体である（以下、本形質転換体と記すこともある。）場合には、このような形質転換体としては、例えば、下記の2つの人為的に付与される能力を同時に有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有する1つのプラスミド、

下記（i）の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA及び下記（ii）の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを同時に有する1つのプラスミド、あるいは、

下記（i）の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有するプラスミド及び下記（ii）の人為的に付与される能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを有するプラスミドからなる2つのプラスミド、

が少なくとも導入されてなる形質転換体等をあげることができる。

<人為的に付与される能力>

（i）1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力

（ii）上記（i）の能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力

【0008】

このような形質転換体は、通常、(1) 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力及び当該能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力の2つの人為的に付与される能力を同時に有する酵素、や(2) 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素及び当該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素の2種類の酵素、を含有している。（以下、前記(1)及び(2)の酵素を総じて本酵素と記すこともある。）。

【0009】

「1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力」の具体的な例としては、例えば、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力をあげることができる。

<アミノ酸配列群>

(a 1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列

(a 2) 配列番号3で示されるアミノ酸配列

(b 1) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(b 2) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c 1) 配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(c 2) 配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d 1) 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(d 2) 配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e 1) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e 2) ペニシリウム属に属する微生物由来の、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【0010】

本形質転換体を作製する際に用いられる、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して 3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な 3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素（即ち、本還元酵素）のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子（以下、本還元酵素遺伝子と記すこともある。）は、（1）天然に存在する遺伝子の中からクローニングされたものであってもよいし、（2）天然に存在する遺伝子であっても、このクローニングされた遺伝子の塩基配列において、その一部の塩基の欠失、置換又は付加が人為的に導入されてなる遺伝子（即ち、天然に存在する遺伝子を変異処理（部分変異導入法、突然変異処理等）を行ったものであってもよいし、（3）人為的に合成されたものであってもよい。

【0011】

ここで、前記（b）、（b 1）又は（b 2）にある「アミノ酸が欠失、置換若

しくは付加された「アミノ酸配列」や前記(d)、(d1)又は(d2)にある「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAに対し相補性を有するDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列」には、例えば、配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列を有する酵素が細胞内で受けるプロセッシング、該酵素が由来する生物の種差、個体差、組織間の差異等により天然に生じる変異や、人為的なアミノ酸の変異等が含まれる。

前記(b)、(b1)又は(b2)にある「(アミノ酸が)欠失、置換若しくは付加(された)」(以下、総じてアミノ酸の改変と記すこともある。)を人為的に行う場合の手法としては、例えば、配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAに対して慣用の部位特異的変異導入を施し、その後このDNAを常法により発現させる手法が挙げられる。ここで部位特異的変異導入法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法(ギャップド・デュプレックス法、Nucleic Acids Res., 12, 9441-9456(1984))、変異導入用プライマーを用いたPCRによる方法等が挙げられる。

前記で改変されるアミノ酸の数については、少なくとも1残基、具体的には1若しくは数個、又はそれ以上である。かかる改変の数は、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン(好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン)を生成する能力を見出すことのできる範囲であればよい。

また前記欠失、置換若しくは付加のうち、特にアミノ酸の置換に係る改変が好ましい。当該置換は、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似した性質を有するアミノ酸への置換がより好ましい。このような置換としては、例えば、①グリシン、アラニン；②バリン、イソロイシン、ロイシン；③アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；④セリン、スレオニン；⑤リジン、アルギニン；⑥フェニルアラニン、チロシンのグループ内での置換が挙げられる。

【0012】

本発明において「(アミノ酸が)欠失、置換若しくは付加(された)」には、例えば、2つの蛋白質間のアミノ酸配列に関する高い配列同一性(具体的には、

80%以上の配列同一性、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性)が存在している必要がある。また「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」には2つのDNA間の塩基配列に関する配列同一性(具体的には、80%以上の配列同一性、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性)が存在している必要がある。

ここで「配列同一性」とは、2つのDNA又は2つの蛋白質間の配列の同一性及び相同性をいう。前記「配列同一性」は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象のDNA又は蛋白質は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失(例えばギャップ等)を有していてもよい。このような配列同一性に関しては、例えば、Vector NTIを用いて、ClustalWアルゴリズム(Nucleic Acid Res., 22(22):4673-4680(1994))を利用してアラインメントを作成することにより算出することができる。尚、配列同一性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GENETYX-MACや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレス <http://www.ddbj.nig.ac.jp>において、一般的に利用可能である。

前記(d)、(d1)又は(d2)にある「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」に関して、ここで使用されるハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版(Molecular Cloning 2nd edition)、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行(Cold Spring Harbor Laboratory press)に記載される方法や、「クローニングとシーケンス」(渡辺格監修、杉浦昌弘編集、1989年、農村文化社発行)に記載されているサザンハイブリダイゼーション法等の通常の方法に準じて行うことができる。また「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、6×SSC(900mM NaCl、90mM クエン酸三ナトリウムを含む溶液。尚ここでは、NaCl 175.3g、クエン酸三ナトリウム88.2gを含む溶液を水800mlで溶解し、10N NaClでpHを調製した後、全量を1000 mlとした溶液を20×SSCとする。)中で65℃にてハイブリッドを形成させた後、2×SSCで50℃にて洗浄するような条件(Molecular Biology, John Wiley &

Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6) 等を挙げることができる。洗浄ステップにおける塩濃度は、例えば、 $2 \times \text{SSC}$ で 50°C の条件（低ストリンジェンシーな条件）から $0.1 \times \text{SSC}$ で 65°C までの条件（高ストリンジェンシーな条件）から選択することができる。洗浄ステップにおける温度は、例えば、室温（低ストリンジェンシーな条件）から 65°C （高ストリンジェンシーな条件）から選択することができる。また、塩濃度と温度の両方を変えることもできる。

【0013】

本還元酵素遺伝子は、例えば、下記のような調製方法に準じて調製すればよい。

コリネバクテリウム・シュードジフテリティカム (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*) 等のコリネバクテリウム属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法に準じて染色体DNAを調製し、調製された染色体DNAを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号2で示される塩基配列を有するDNA等を増幅して本還元酵素遺伝子を調製する。

ここでコリネバクテリウム・シュードジフテリティカム由来の染色体DNAを鋳型として、かつ配列番号5に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号6に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行う場合には、配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを増幅して本還元酵素遺伝子を調製することになる。

当該PCRの条件としては、例えば、4種類のdNTPを各々 $20 \mu\text{M}$ 、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々 15 pmol 、Taq polymeraseを 1.3 U 及び鋳型となるcDNAライブラリーを混合した反応液を 97°C （2分間）に加熱した後、 97°C （ 0.25 分間）－ 50°C －（ 0.5 分間）－ 72°C （ 1.5 分間）のサイクルを10回、次いで 97°C （ 0.25 分間）－ 55°C （ 0.5 分間）－ 72°C （ 2.5 分間）のサイクルを20回行い、さらに 72°C で7分間保持する条件が挙げられる。

尚、当該PCRに用いるプライマーの5'末端側には、制限酵素認識配列等を付加していてもよい。

上記のようにして増幅されたDNAを、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. 著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして組換えベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119 (宝酒造社製)、pTV118N (宝酒造社製)、pBluescriptII (東洋紡社製)、pCR2.1-TOPO (Invitrogen社製)、pTrc99A (Pharmacia社製)、pKK223-3 (Pharmacia社製) 等が挙げられる。このようにしてベクターに組み込んだ形態で本還元酵素遺伝子を調製すれば、後の遺伝子工学的手法における使用において便利である。

【0014】

また、ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) 等のペニシリウム属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法 (例えば、「新 細胞工学実験プロトコール」(東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年) に記載された方法) に準じてcDNAライブラリーを調製し、調製されたcDNAライブラリーを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号4で示される塩基配列を有するDNA等を増幅して本還元酵素遺伝子を調製する。

ここでペニシリウム・シトリナム由来のcDNAライブラリーを鋳型として、かつ配列番号7に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号8に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行う場合には、配列番号4で示される塩基配列からなるDNAを増幅して本還元酵素遺伝子を調製することになる。

【0015】

1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素（以下、本補酵素再生酵素遺伝子と記すこともある。）は、例えば、本補酵素再生酵素遺伝子が本還元酵素とは異なる酵素である場合には、下記のような調製方法に準じて調製すればよい。

バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 等のバシラス属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法に準じて染色体DNAを調製し、調製された染色体DNAを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号12で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号12で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号11で示される塩基配列を有するDNA等を増幅して本補酵素再生酵素遺伝子を調製する。

ここでバシラス・メガテリウム由来の染色体DNAを鋳型として、かつ配列番号9に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号10に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行う場合には、配列番号11で示される塩基配列からなるDNAを増幅して本補酵素再生酵素遺伝子を調製することになる。

当該PCRの条件としては、例えば、4種類のdNTPを各々20 μ M、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々15 pmol、Taq polymeraseを1.3 U及び鋳型となるcDNAライブラリーを混合した反応液を97℃（2分間）に加熱した後、97℃（0.25分間）-50℃（0.5分間）-72℃（1.5分間）のサイクルを10回、次いで97℃（0.25分間）-55℃（0.5分間）-72℃（2.5分間）のサイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持する条件が挙げられる。

尚、当該PCRに用いるプライマーの5'末端側には、制限酵素認識配列等を付加していてもよい。

上記のようにして増幅されたDNAを、Sambrook J., Frisch E. F., Maniati

s T. 著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして組換えベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119 (宝酒造社製)、pTV118N (宝酒造社製)、pBluescriptII (東洋紡社製)、pCR2.1-TOPO (Invitrogen社製)、pTrc99A (Pharmacia社製)、pKK223-3 (Pharmacia社製)等が挙げられる。このようにしてベクターに組み込んだ形態で本還元酵素遺伝子を調製すれば、後の遺伝子工学的手法における使用において便利である。

【0016】

本形質転換体を調製する方法としては、例えば、(1)本還元酵素遺伝子及び宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で接続されてなるDNAのような、本還元酵素遺伝子が宿主細胞中で発現できるような組換えプラスミド (例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域を本還元酵素遺伝子に連結して組換えプラスミドを構築したり、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させるような組換えプラスミド) を作製し、これを宿主細胞に導入することにより作製する方法、(2)本還元酵素遺伝子と本補酵素再生酵素遺伝子との両遺伝子及び宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で接続されてなるDNAのような、本遺伝子が宿主細胞中で発現できるような単一の組換えプラスミドを作製し、これを宿主細胞に導入することにより作製する方法、(3)本還元酵素遺伝子と本補酵素再生酵素遺伝子との両遺伝子のうちの一方の遺伝子及び宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で接続されてなるDNAのような、本遺伝子のうちの一方の遺伝子が宿主細胞中で発現できるような組換えプラスミドを上記遺伝子毎に別々に作製し、これらを宿主細胞に導入することにより作製する方法等があげられる。さらに、一方の遺伝子又は両遺伝子を宿主細胞の染色体中に導入する方法も利用することができる。

尚、上記単一の組換えプラスミドを宿主細胞に導入することにより作製する方法としては、例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域をそれぞれの両遺伝子に連結して組換えプラスミドを構築したり、ラクトースオペロ

ンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させるような組換プラスミドを構築する方法等をあげることができる。

上記の組換プラスミドとしては、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、検出可能なマーカーを持つ発現ベクターに、本還元酵素をコードする遺伝子が機能可能な形で導入されたものを好ましく挙げることができる。尚、発現ベクターとしては、各種のものが市販されている。

ここで、「機能可能な形で」とは、上記の組換プラスミドを宿主細胞に導入することにより宿主細胞を形質転換させた際に、本還元酵素遺伝子が、プロモーターの制御下に発現するようにプロモーターと結合された状態にあることを意味する。プロモーターとしては、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、又は、tacプロモーターもしくはtrcプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター等をあげることができる。またコリネバクテリウム・シュドジフテリティカム、ペニシリウム・シトリナム、バシラス・メガテリウムにおいて本還元酵素遺伝子の発現を制御しているプロモーターを利用してもよい。

また発現ベクターとしては、選択マーカー遺伝子（例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性付与遺伝子等）を含むベクターを用いると、当該ベクターが導入された形質転換体を当該選択マーカー遺伝子の表現型等を指標にして容易に選択することができる。

さらなる高発現を導くことが必要な場合には、本還元酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子上流にリボソーム結合領域を連結してもよい。用いられるリボソーム結合領域としては、Guarente L.ら (Cell 20, p543) や谷口ら (Genetics of Industrial Microorganisms, p202, 講談社) による報告に記載されたものを挙げることができる。

宿主細胞としては、原核生物（例えば、Escherichia属、Bacillus属、Corynebacterium属、Staphylococcus属、Streptomyces属）もしくは真核生物（例えば、Saccharomyces属、Kluyveromyces属、Aspergillus属）である微生物細胞、昆虫

細胞又は哺乳動物細胞等を挙げることができる。例えば、本形質転換体の大量調製が容易になるという観点では、大腸菌等を好ましく挙げることができる。

本還元酵素が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、用いられる宿主細胞に応じて通常使われる導入方法であればよく、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される塩化カルシウム法や、「Methods in Electroporation: Gene Pulser / E.coli Pulser System」 Bio-Rad Laboratories, (1993)等に記載されるエレクトロポレーション法等をあげることができる。

宿主細胞において本還元酵素遺伝子及び／又は本補酵素再生酵素遺伝子が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドが導入された形質転換体を選抜するには、前記の如く、例えば、ベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の表現型を指標にして選抜すればよい。

プラスミドが導入された宿主細胞（即ち、形質転換体）が本還元酵素遺伝子及び／又は本補酵素再生酵素遺伝子を保有していることは、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載される通常の方法に準じて、制限酵素部位の確認、塩基配列の解析、サザンハイブリダイゼーション、ウェスタンハイブリダイゼーション等を行うことにより、確認することができる。

【0017】

本形質転換体の培養は、微生物培養、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞の培養に使用される通常の方法によって行うことができる。例えば大腸菌の場合、適当な炭素源、窒素源およびビタミン等の微量栄養物を適宜含む培地中で培養を行う。培養方法としては、固体培養、試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーマンター (Jar Fermenter) 培養、タンク培養等の液体培養のいずれの方法でもよく、好ましくは、通気攪拌培養法等の液体培養を挙げることができる。

培養温度は、本形質転換体が生育可能な範囲で適宜変更できるが、通常約10～50℃、好ましくは約20～40℃である。

培地は約 6～8 の範囲が好ましい。

培養時間は、培養条件によって異なるが通常約 1 日～約 5 日が好ましい。

本形質転換体を培養するための培地としては、例えば、微生物等の宿主細胞の培養に通常使用される炭素源や窒素源、有機塩や無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。

炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、シュークロース等の糖類、グリセロール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸、動物油、植物油及び糖蜜が挙げられる。これらの炭素源の培地への添加量は培養液に対して通常 0.1～30% (w/v) 程度である。

窒素源としては、例えば、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーン・スティープ・リカー (Corn Steep Liquor)、綿実粉、乾燥酵母、カザミノ酸等の天然有機窒素源、アミノ酸類、硝酸ナトリウム等の無機酸のアンモニウム塩、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩及び尿素が挙げられる。これらのうち有機酸のアンモニウム塩、天然有機窒素源、アミノ酸類等は多くの場合には炭素源としても使用することができる。これらの窒素源の培地への添加量は培養液に対して通常 0.1～30% (w/v) 程度である。

有機塩や無機塩としては、例えば、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛等の塩化物、硫酸塩、酢酸塩、炭酸塩及びリン酸塩を挙げることができる。具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化コバルト、硫酸亜鉛、硫酸銅、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素一カリウム及びリン酸水素二カリウムが挙げられる。これらの有機塩及び／又は無機塩の培地への添加量は培養液に対して通常 0.0001～5% (w/v) 程度である。

さらに、tacプロモーター、trcプロモーター及びlacプロモーター等のアロラクトースで誘導されるタイプのプロモーターと、本酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子とが機能可能な形で接続されてなるDNAが導入されてなる形質転換体の場合には、本酵素の生産を誘導するための誘導剤として、

例えば、isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) を培地中に少量加えることもできる。

【0018】

本形質転換体の取得は、例えば、前記の培養により得られた培養物を遠心分離等により形質転換体を沈殿物として回収すればよい。必要に応じて、回収前に当該形質転換体を、例えば、100mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー (pH6.5) 等の緩衝液等を用いて洗浄してもよい。

【0019】

本発明製造方法では、1,3-シクロヘキサジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成させるための触媒として、1,3-シクロヘキサジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が使用される。

1,3-シクロヘキサジオンを還元する能力を有する酵素を産生する微生物の、本発明製造方法の反応に用いる形態には、例えば、(1) 培養液をそのまま用いる形態、(2) 培養液の遠心分離等により菌体を集め、当該菌体を緩衝液若しくは水で洗浄することにより得られた湿菌体を用いる形態、等の培養により得られた微生物の菌体をその用いる形態が含まれる。

1,3-シクロヘキサジオンを還元する能力を有する酵素あるいは当該酵素又は当該酵素を産生する微生物の処理物の、本発明製造方法の反応に用いる形態には、例えば、培養液の遠心分離等により菌体を集め、当該菌体を緩衝液若しくは水で洗浄した湿菌体を、(1) 有機溶媒（アセトン、エタノール等）処理することにより得られたものを用いる形態や(2) 凍結乾燥処理することにより得られたものを用いる形態や(3) アルカリ処理することにより得られたものを用いる形態や(4) 菌体を物理的に又は酵素的に破碎することにより得られたものを用いる形態、さらには、これらのものを公知の方法により固定化処理することにより得られたものを用いる形態も含まれる。

【0020】

1,3-シクロヘキサジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生

する微生物、あるいはそれらの処理物のうち、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞が好ましく使用される。

【0021】

本形質転換体から、その死菌化細胞を下記の方法により調製することもできる。

死菌化処理方法としては、例えば、物理的殺菌法（加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、濾過、通電）や、化学薬品を用いる殺菌法（アルカリ、酸、ハロゲン、酸化剤、硫黄、ホウ素、砒素、金属、アルコール、フェノール、アミン、サルファイド、エーテル、アルデヒド、ケトン、シアン、抗生物質）をあげることができる。尚、これらの殺菌法のうちできるだけ本還元酵素の酵素活性を失活させず、かつ反応系への残留、汚染などの影響が少ない処理方法を各種の反応条件に応じて適宜選択することがよい。

【0022】

このようにして調製された形質転換体又はその死菌化細胞は、例えば、凍結乾燥細胞、有機溶媒処理細胞、乾燥細胞等の形態、あるいは、固定化された形態（固定化物）で利用してもよい。

【0023】

固定化物を得る方法としては、例えば、担体結合法（シリカゲルやセラミック等の無機担体、セルロース、イオン交換樹脂等に本形質転換体又はその死菌化細胞を吸着させる方法）及び包括法（ポリアクリルアミド、含硫多糖ゲル（例えばカラギーナンゲル）、アルギン酸ゲル、寒天ゲル等の高分子の網目構造の中に本形質転換体又はその死菌化細胞を閉じ込める方法）が挙げられる。

【0024】

続いて、本発明製造方法における触媒反応について説明する。

本発明製造方法において1, 3-シクロヘキサンジオンを3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）に変換する反応は、例えば、1, 3-シクロヘキサンジオンに本還元酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物（及び、必要に応じて補酵素）を

作用させることによって達成される。

当該反応は、通常、水の存在下で行われる。水は緩衝液の形態であってもよく、この場合に用いられる緩衝剤としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸のアルカリ金属塩が挙げられる。

尚、緩衝液を溶媒として用いる場合、その量は 1, 3-シクロヘキサンジオン 1 重量部に対して、通常、1~300 重量倍、好ましくは 5~100 重量倍である。

当該反応に際しては、1, 3-シクロヘキサンジオンを反応系内に連続又は逐次加えてもよい。

【0025】

反応温度としては、本還元酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に含まれた本還元酵素の安定性、反応速度の点から 0~70℃程度をあげることができ、好ましくは約 10~40℃があげられる。

反応 pH としては、反応が進行する範囲内で適宜変化させることができるが、例えば、5~8 をあげることができる。

【0026】

反応は、水の他に有機溶媒の共存下に行うこともできる。この場合の有機溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、*t*-ブチルメチルエーテル、イソプロピルエーテル等のエーテル類、トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、イソオクタン、デカン等の炭化水素類、*t*-ブタノール、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキサイドなどのスルホキサイド類、アセトン等のケトン類、アセトニトリル等のニトリル類及びこれらの混合物が挙げられる。

反応に使用する有機溶媒の量は、1, 3-シクロヘキサンジオンに対して、通常、100 重量倍以下であり、好ましくは 70 重量倍以下である。

【0027】

反応は、例えば、NADH、NADPH のような補酵素を加えて通常行うことがよい。

反応に用いられる補酵素の量は、1, 3-シクロヘキサンジオンに対して、通常、0.5重量倍以下、好ましくは0.1重量倍以下である。

【0028】

本発明製造方法では、1, 3-シクロヘキサンジオンの還元反応において化学量論量の還元型補酵素（電子供与体）が消費された結果生じた酸化型補酵素（電子受容体）を、再び還元型補酵素（電子供与体）に変換する能力、即ち、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノン（好ましくは、光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノン）を生成する能力を有する酵素が依存する補酵素を再生する能力、を有する酵素（即ち、本補酵素再生酵素）の利用が好ましい。この場合には、本補酵素再生酵素は、前記還元反応を行う本還元酵素とは異なる酵素であってもよいし、また本還元酵素が補酵素再生酵素としての機能を合わせ持つものであってもよい。もちろん両者の組み合わせであってもよい。

ここで、「本還元酵素が補酵素再生酵素としての機能を合わせ持つもの」であることは、例えば、単離された本還元酵素を用いて酸化型補酵素（電子受容体）の存在下で、補酵素再生酵素の基質である再生系原料化合物を酸化させる反応を行うことにより還元型補酵素（電子供与体）を生じるか否かを調べることにより確認すればよい。

本補酵素再生酵素としては、例えば、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素及び有機脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素等）等が挙げられる。中でも、脂肪族アルコール（例えば、2-プロパノール、2-ブタノール、2-ペンタノール、2-ヘキサノール、2-ヘプタノール、2-オクタノール等の200℃以下の沸点をもつアルコール等）を還元することにより補酵素再生を行う補酵素再生酵素が好ましい。この場合に用いられる脂肪族アルコールの量は、1, 3-シクロヘキサンジオンに対して100モル倍以下、好ましくは10モル倍以下である。

反応はさらに、必要に応じて、グルコース、シュクロース、フルクトース等の糖類、エタノール等のアルコール類、界面活性剤等を加えて行うこともできる。

【0029】

反応の終点は、例えば、反応液中の原料化合物の存在量を液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等により追跡することにより決定することができる。反応時間の範囲としては、通常、5分間～10日間、好ましくは30分間～4日間の範囲をあげることができる。

【0030】

反応終了後は、触媒として酵素や微生物等を使用して化合物を製造する方法において通常用いられる化合物の回収方法により目的物を採取すればよい。例えば、まず反応液をヘキサン、ヘプタン、tert-ブチルメチルエーテル、酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出する。必要に応じて反応液を濾過したり、又は遠心分離等の処理により不溶物を除去した後に前記抽出操作を行えばよい。次に抽出された有機層を乾燥した後、濃縮物として目的物を回収することができる。目的物は、必要によりカラムクロマトグラフィー等によりさらに精製することができる。

【0031】

【実施例】

以下、製造例等により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0032】

実施例1 (本還元酵素遺伝子の調製(その1)及び本還元酵素遺伝子を含む形質転換体の調製)

配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを含むプラスミドpKARを以下のようにして調製した。

まず、Appl. Microbial Biotechnol (1999) 52:386-392等に記載される公知のプラスミドpUAR(受託番号FERM P-18127)から、配列番号2で示されるDNAを含むDNA断片を、PstI及びSmaIを用いて切り出した。切り出されたDNA断片を、PstI/SmaI処理したpKK223-3ベクター(Amersham Pharmacia Biotech社製)のTacプロモーターの下流に挿入した。このようにしてプラスミドpKARを構築した。

構築されたプラスミドpKARを用いてE. coli JM109株を形質転換した。

次に、フラスコに液体培地（水1000mlにトリプトン10g、酵母エキス5g及び塩化ナトリウム5gを溶解した。この溶液に1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpHを7.0に調整した。）100mlを入れ、滅菌した後、アンピシリンを100 μ g/ml、ZnCl₂を0.01% (w/v)、isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) を0.4mMになるように加えた。このようにして調製された培地に、上記で得られた形質転換体（E. coli JM109/pKAR株）が前記組成の液体培地で予め培養された培養液0.3mlを接種し、これを30℃で14時間振盪培養した。

培養後、得られた培養液を遠心分離（15000 \times g、15分、4℃）することにより、菌体を回収した。回収された菌体を、50mMリン酸1カリウムーリン酸2カリウムバッファー（pH7.0）30mlに懸濁し、この懸濁液を遠心分離（15000 \times g、15分、4℃）することにより、本還元酵素遺伝子を含む形質転換体である洗浄菌体を得た。

【0033】

実施例2 （本還元酵素遺伝子の調製（その2））

（2-1）染色体DNAの調製

フラスコに液体培地（水1000mlにトリプトン5g、酵母エキス2.5g、塩化ナトリウム4g、ゼラチン2.5g、酢酸ナトリウム1.5g及びスレオニン2.4gを溶解する。この溶液に1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpHを7.0に調整する。）100mlを入れ、滅菌する。このようにして調製された培地に、特開平10-94399等に記載される公知のコリネバクテリウム・シュードジフテリティカム亜種（*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*）S T-10株（受託番号FERM P-13150）が前記組成の液体培地で予め培養された培養液0.3mlを接種し、これを30℃で10時間振盪培養する。

培養後、得られた培養液を遠心分離（15000 \times g、15分、4℃）することにより、菌体を回収する。回収された菌体を、50mMリン酸1カリウムーリン酸2カリウムバッファー（pH7.0）30mlに懸濁し、この懸濁液を遠心分離（15000 \times g、15分、4℃）することにより、洗浄菌体を得る。

このようにして得られる洗浄菌体を用いて、J.C.Wangらの方法 (Appl Microbiol Biotechnol (1999)52:386-392) によって染色体DNAを調製する。

【0034】

(2-2) 本還元酵素遺伝子を含有するプラスミドの調製 (プラスミド pTrc PARの構築)

配列番号5で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号6で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに、前記(2-1)で調製される染色体DNAを鋳型にして下記反応液組成、反応条件でPCRを行う。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【0035】

[反応液組成]

染色体DNA	1 μ l
dNTP (各2.5mM-mix)	0.4 μ l
プライマー (20pmol/ μ l)	各0.75 μ l
10xbuffer (with MgCl ₂)	5 μ l
enz. expandHiFi (3.5 x 10 ³ U/ml)	0.375 μ l
超純水	41.725 μ l

【0036】

[反応条件]

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃(2分間)に加熱した後、97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(1.5分間)のサイクルを10回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持する。

【0037】

PCR反応液を精製して得られたPCR増幅DNA断片に2種類の制限酵素 (NcoI及びBamHI) を加えることにより、当該DNA断片を2重消化する。次いで得られるDNA断片を精製する。

一方、ベクター p T r c 9 9 A (Pharmacia製) を 2 種類 の 制限酵素 (NcoI 及び BamHI) を 加える ことにより、当該ベクターを 2 重消化する。次いで得られる DNA 断片を精製する。

このようにして精製して得られる 2 種類 の DNA 断片を混合し、T4 DNA リガーゼでライゲーションする。得られるライゲーション液で E. coli DH5 α を形質転換する。

得られる形質転換体から QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製) を用いて本還元酵素遺伝子を含むプラスミド (以下、プラスミド p T r c P A R と記すこともある。) を取り出す。

【 0 0 3 8 】

実施例 3 (本還元酵素遺伝子の調製 (その 3))

(3-1) cDNA ライブラリーの調製

500 ml フラスコに培地 (水にポテト・デキストロース・ブロー (ベクトン・ディッキンソン社製) を 24 g/L の割合で溶解したもの) 100 ml を入れ、121℃ で 15 分間滅菌した。ここに同組成の培地中で培養 (30℃、48 時間、振盪培養) したペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) IF0463 1 株 (財団法人 発酵研究所 (www.ifo.or.jp) から入手可能) の培養液 0.5 ml を加え、30℃ で 72 時間振盪培養した。その後、得られた培養液を遠心し (8000 x g、10 分)、生じた沈殿を集めた。この沈殿を 20 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) 50 ml で 3 回洗浄して、約 1.0 g の洗浄菌体を得た。

得られた洗浄菌体を用いて、チオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法で全 RNA を調製した。調製された全 RNA から、Oligotex(dT)30-Super (宝酒造社製) を用いて poly(A) を有する RNA を得た。

cDNA ライブラリーの作製は、Gubler and Hoffman 法に基づいて実施した。まず、上記のようにして得られた poly(A) を有する RNA、Oligo(dT)18-リンカープライマー ((含 XhoI サイト) 宝酒造社製)、RAV-2 Rtase 及び SuperScript I Rtase を用いて一本鎖 cDNA を調製した。調製された一本鎖 cDNA (を含む前記反応液) に E. coli DNA polymerase、E. coli Rnase/E. coli DNA Ligase Mix

ture及びT4 DNA Polymeraseを加えることにより、二本鎖cDNAの合成及び当該二本鎖cDNAの平滑末端化処理を行った。

このようにして得られた二本鎖cDNAとEcoRI-NotI-BamHIアダプター（宝酒造社製）とのライゲーションを行った。ライゲーション後に得られたDNAを、以下の順で、リン酸化処理、XhoIでの切断処理、スピンカラム（宝酒造社製）を用いる低分子量DNAの除去処理、λ ZapII（EcoRI-XhoI切断）とのライゲーションした後、in vitro packaging kit（STRATAGENE社製）を用いてパッケージングすることにより、cDNAライブラリー（以下、cDNAライブラリー（A）と記すこともある。）を調製した。

【0039】

（3-2）本還元酵素遺伝子を含有するプラスミドの調製（プラスミドpTrcR P cの構築）

配列番号7で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号8で示されるオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、前記（3-1）で調製されたcDNAライブラリーを鋳型にして下記反応液組成、反応条件でPCRを行った。（ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用）

【0040】

〔反応液組成〕

cDNAライブラリー原液	1 μ l
d N T P (各2.5mM-mix)	0.4 μ l
プライマー (20pmol/ μ l)	各0.75 μ l
10×buffer(with MgCl ₂)	5 μ l
enz.expandHiFi (3.5×10 ³ U/ml)	0.375 μ l
超純水	41.725 μ l

【0041】

〔反応条件〕

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃（0.25分間）-55℃（0

5分間)-72℃(1.5分間)のサイクルを10回、次いで97℃(0.25分間)-55℃(0.5分間)-72℃(2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72℃で7分間保持した。

【0042】

PCR反応液を精製して得られたPCR増幅DNA断片に2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該DNA断片を2重消化させた。次いで得られたDNA断片を精製した。

一方、ベクターpTrc99A(Pharmacia製)を2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該ベクターを2重消化させた。次いで消化されたDNA断片を精製した。

このようにして精製して得られた2種類のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションした。得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen社製)を用いて本還元酵素遺伝子を含むプラスミド(以下、プラスミドpTrcRPeと記すこともある。)を取り出した。

【0043】

実施例4 (本補酵素再生酵素遺伝子の調製)

(4-1)酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等を還元型に変換する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子を調製するための準備

フラスコにLB培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1%塩化ナトリウム)100mlを入れ、滅菌した。このようにして調製された培地に、*Bacillus megaterium* IF012108株(財団法人 発酵研究所 (www.ifo.or.jp) から入手可能)が前記組成の液体培地で予め培養された培養液0.3mlを接種し、これを30℃で10時間振盪培養した。

培養後、得られた培養液を遠心分離(15000 \times g、15分、4℃)することにより、菌体を回収した。回収された菌体を、50mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー(pH7.0)30mlに懸濁し、この懸濁液を遠心

分離 (15000×g、15分、4℃) することにより、洗浄菌体を得た。

このようにして得られた洗浄菌体からQiagen Genomic Tip (Qiagen社製)を用い、それに付属するマニュアルに記載される方法に従って染色体DNAを精製した。

【0044】

(4-2) 酸化型β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド等を還元型に変換する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の調製 (その1: プラスミドpSDGDH12の構築)

The Journal of Biological Chemistry Vol.264, No.11, 6381-6385(1989)に記載された公知の*Bacillus megaterium* IWG3由来のグルコース脱水素酵素のアミノ酸配列に基づいて配列番号9で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号10で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとを合成する。

配列番号9で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号10で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、前記(4-1)で精製された染色体DNAを鋳型にして実施例2(2-2)に記載させる反応液組成、反応条件でPCRを行う。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

PCR反応液を精製して得られたPCR増幅DNA断片を、Invitrogen社製TOPOTMTA cloningキットを用いてpCR2.1-TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションする。得られるライゲーション液で*E. coli* DH5αを形質転換する。

得られる形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてグルコース脱水素酵素を含有するプラスミド (以下、プラスミドpSDGDH12と記すこともある。)を取り出す。

次に、取り出されるプラスミドpSDGDH12を鋳型として、Dye Terminator Cycle sequencing FS ready Reaction Kit (パーキンエルマー製)を用いたシーケンス反応を行った後、得られるDNAの塩基配列をDNAシーケンサー373A (パーキンエルマー製)で解析する。その結果を配列番号11に示す。

【0045】

(4-3) 酸化型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸等を還元型に変換する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子の調製(その2:プラスミドpAGDH12の構築)

(4-3-1) プラスミドpTG β DH12の構築

配列番号11で示される塩基配列を基にして配列番号13で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとを合成した。

配列番号13で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、前記(4-1)で精製された染色体DNAを鋳型にして以下の反応液組成、反応条件でPCRを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【0046】

[反応液組成]

染色体DNA原液	1 μ l
dNTP(各2.5mM-mix)	0.4 μ l
プライマー(20pmol/ μ l)	各0.75 μ l
10xbuffer(with MgCl ₂)	5 μ l
enz.expandHiFi (3.5 $\times 10^3$ U/ml)	0.375 μ l
超純水	41.725 μ l

【0047】

[PCR反応条件]

上記組成に反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400にセットし、97 $^{\circ}$ C(2分間)に加熱した後、97 $^{\circ}$ C(0.25分間)-55 $^{\circ}$ C(0.5分間)-72 $^{\circ}$ C(1.5分間)のサイクルを10回、次いで97 $^{\circ}$ C(0.25分間)-55 $^{\circ}$ C(0.5分間)-72 $^{\circ}$ C(2.5分間)のサイクルを20回、さらに72 $^{\circ}$ Cで7分間保持した。

【0048】

PCR反応液を精製して得られたPCR増幅DNA断片に2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該DNA断片を2重消化させた。次い

で得られたDNA断片を精製した。

一方、ベクター pTV118N (宝酒造社製) を2種類の制限酵素 (NcoI及び BamHI) を加えることにより、当該ベクターを2重消化させた。次いで消化されたDNA断片を精製した。

このようにして精製して得られた2種類のDNA断片を混合し、T4 DNA リガーゼでライゲーションした。得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製) を用いて本還元酵素遺伝子を含むプラスミド (以下、プラスミド pTGDH12 と記すこともある。) を取り出した。

【0049】

(4-3-2) プラスミド pCGDH12 の構築

ベクター pTV118N (宝酒造社製) の塩基配列を基にして配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、プラスミド pTGDH12 を鋳型にして以下の反応液組成、反応条件でPCRを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

【0050】

[反応液組成]

プラスミド pTGDH12 溶液	1 μ l
dNTP (各2.5mM-mix)	0.4 μ l
プライマー (20pmol/ μ l)	各0.75 μ l
10xbuffer (with MgCl)	5 μ l
enz.expandHiFi (3.5×10^3 U/ml)	0.375 μ l
超純水	41.725 μ l

【0051】

[PCR反応条件]

上記組成に反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400にセットし、97℃（2分間）に加熱した後、97℃（0.25分間）-55℃（0.5分間）-72℃（1.5分間）のサイクルを10回、次いで97℃（0.25分間）-55℃（0.5分間）-72℃（2.5分間）のサイクルを20回、さらに72℃で7分間保持した。

【0052】

得られたPCR反応液とInvitrogen社製TOPOTMTA cloningキットVer.Eとを用いて、PCRによって得られた約1000bpのDNA断片をpCR2.1-TOPOベクターの既存「PCR Product挿入サイト」にライゲーションし、そのライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いて本還元酵素遺伝子を含むプラスミド（以下、プラスミドpCGDH12と記すこともある。）を取り出した。

【0053】

（4-3-3）プラスミドpAGDH12の構築

プラスミドpCGDH12に制限酵素（BamHI）を加えることにより、当該プラスミドを消化した。次いで、得られるDNA断片（約1000bp）を精製した。

一方、ベクターpACYC184（ニッポンジーン社製）に制限酵素（BamHI）を加えることにより、当該ベクターを消化した。次いで得られるDNA断片を精製した。さらに、セルフライゲーションを防ぐため、Alkaline Phosphatase（宝酒造社製）を用いて脱リン酸化処理を行った。

【0054】

このようにして精製して得られた2種類のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションした。得られたライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地で培養し、生育してきたコロニーの中から4コロニーを無作為に選抜した。この選抜されたコロニーをそれぞれ20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含む滅菌LB培地（2ml）に接種し、試験管中で振盪培養した（30℃

、24時間)。それぞれの培養菌体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いてプラスミドを取り出した。取り出したプラスミドのそれぞれの一部を制限酵素 (BamHI) により消化した後、当該消化物を電気泳動することにより、取り出されたプラスミド全てには前記DNA断片 (約1000bp) が挿入されていることを確認した。(以下、取り出されたプラスミドをプラスミドpAGDH12と記すこともある。)

【0055】

実施例5 (本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生酵素遺伝子を含有するプラスミドの調製(その1): プラスミドpTrcPARSbGの構築)

実施例4(4-2)で調製されたプラスミドpSDGDH12に2種類の制限酵素 (BamHIとXbaI) を加えることにより、当該プラスミドを2重消化させる。次いで消化されたDNA断片を精製する。

一方、実施例2で調製されるプラスミドpTrcPARに2種類の制限酵素 (BamHIとXbaI) を加えることにより、当該プラスミドを2重消化させる。次いで得られるDNA断片を精製する。

このようにして精製して得られる2種類のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションする。得られるライゲーション液でE. coli DH5 α を形質転換する。

得られる形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いて本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生遺伝子を含有するプラスミド(以下、プラスミドpTrcPARSbGと記すこともある。)を取り出す。

【0056】

実施例6 (本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生遺伝子を含有するプラスミドの調製(その2): プラスミドpTrcRSbG12の構築)

実施例4(4-2)で調製されたプラスミドpSDGDH12に2種類の制限酵素 (BamHIとXbaI) を加えることにより、当該プラスミドを2重消化させた。次いで消化されたDNA断片を精製した。

一方、実施例3で調製されるプラスミドpTrcRPeに2種類の制限酵素 (BamHIとXbaI) を加えることにより、当該プラスミドを2重消化させた。次いで

消化されたDNA断片を精製した。

このようにして精製して得られた2種類のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションした。得られたライゲーション液で*E. coli* DH5 α を形質転換した。

得られた形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いて本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生酵素遺伝子を含有するプラスミド(以下、プラスミドpTrcRSbG12と記すこともある。)を取り出した。

【0057】

実施例7 (本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生酵素遺伝子を含有する形質転換体の調製(その1))

実施例5で調製されるプラスミドpTrcPARSbGを用いて*E. coli* HB101を形質転換する。得られる形質転換体を0.4 mMのIPTG、0.01% (W/V)のZnCl₂及び50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地(100 ml \times 3本)に接種した後、これを振盪培養する(30 $^{\circ}$ C、18時間)。培養後、培養液を遠心分離・洗浄することにより、洗浄菌体を回収する。

【0058】

実施例8 (本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生酵素遺伝子を含有する形質転換体の調製(その2))

実施例6で調製されたpTrcRSbG12プラスミドを用いて*E. coli* HB101を形質転換した。得られた形質転換体を0.1 mMのIPTG及び50 μ g/mlのアンピシリンを含有する滅菌LB培地(100 ml \times 3本)に接種した後、これを振盪培養した(30 $^{\circ}$ C、18時間)。培養後、培養液を遠心分離・洗浄することにより、洗浄菌体1.2 gを回収した。

【0059】

実施例9 (本還元酵素遺伝子及び本補酵素再生酵素遺伝子を含有する形質転換体の調製(その3))

実施例3で調製されるプラスミドpTrcRPe及び実施例4(4-3)で調製されたプラスミドpAGDH12を用いて*E. coli* HB101を形質転換する。得られる形質転換体を0.4 mMのIPTG、20 μ g/mlのクロラムフェニコ

ール及び50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含有する滅菌LB培地 (100 ml \times 3本) に接種した後、これを振盪培養する (30℃、18時間)。培養後、培養液を遠心分離・洗浄することにより、洗浄菌体を回収する。

【0060】

実施例10 (3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法)

100 mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー (pH 6.5) 2.0 ml に、実施例1で調製された洗浄菌体15mg、 NAD^+ 2.5 mg (オリエンタル酵母社試薬) 及び5% (v/v) の2-プロパノールを加えた。この混合物に、さらに50 mgの1,3-シクロヘキサンジオン (アルドリッチ社試薬) 加えた。このようにして得られた混合物 (反応液) を30℃で21時間攪拌することにより反応を行った。反応終了後、反応液に酢酸ブチル 2.0 ml を注加攪拌し、次いで遠心分離することにより有機層及び水層を別々に回収した。GC分析により、3-ヒドロキシシクロヘキサノンの生成を確認した。収率11% (GC分析) であった。

GC条件

カラム: DB-1 (0.53 mm Φ \times 3.0 m、1.5 μm)

注入口温度: 170℃

検出器 (FID) : 300℃

カラム室温度: 70℃ (保持: 5分) \rightarrow 5℃/分 \rightarrow 170℃ (保持: 0分) \rightarrow (昇温: 30℃/分) \rightarrow 290℃

キャリアガス 10 mL/分

3-ヒドロキシシクロヘキサノンの保持時間 9.2分

3-ヒドロキシシクロヘキサノンは文献既知の方法により調製した (ジャーナル オブ オーガニック ケミストリ (2001) 1046ページ)

【0061】

実施例12 (3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法 (その2))

100 mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー (pH 6.5) 25 gに、市販酵素であるKRED1004 (米国、バイオキャタリティックス社製) 10 mg、 NADP^+ 25 mg (オリエンタル酵母社試薬) 及びグルコース 1.0 g、市販酵素であるグルコースデヒドロゲナーゼ (アマノ製薬製) を加えた。この混合物に、さらに50 mgの1,3-シクロヘキサンジオンを加えた後、当該混合物を30℃で4時間攪拌することにより反応を行った。反応中は15%炭酸ナトリウム水を適宜加えることにより反応液pH 6.4~6.5に保った。反応終了後、反応液に酢酸エチル25 mlを注加攪拌し、次いで遠心分離することにより有機層及び水層を別々に回収した。回収される水層に再度酢酸エチル25 mlを加えて同様な操作を2度行なった。このようにして得られる有機層を合一濃縮した後、これをクロロホルム30 mlに溶解し、無水 Na_2SO_4 を用いて乾燥する。乾燥後、クロロホルムを留去することにより、下記物性を有する3-ヒドロキシシクロヘキサノン (20 mg) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (δ , ppm, CDCl_3) ; 1.8 (2H, m), 2.0 (2H, m), 2.4 (2H, m), 2.7 (2H, m), 4.2 (1H, m)

$[\alpha]_D = -18^\circ$ ($c = 0.25$, CDCl_3)

【0062】

参考例1 (1,3-シクロヘキサンジオンを還元して3-ヒドロキシシクロヘキサノンを生産する能力を有する微生物の取得)

(1-1) 洗浄菌体の調製

市販の微生物又は土壌などから単離した微生物を滅菌LB培地 (10 ml) に接種した後、これを振盪培養する (30℃、18時間)。培養後、培養液を遠心分離・洗浄することにより、洗浄菌体を回収する。

(1-2) スクリーニング

100 mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー (pH 6.5) 20 mlに、上記 (1-1) で調製された洗浄菌体1 g、 NADP^+ 12 mg、NA

D⁺12 mg 及びグルコース 2.5 g を加える。この混合物に、さらに 1, 3-シクロヘキサジオン 240 mg のを加えた後、当該混合物の pH を 15% 炭酸ナトリウム水溶液で 6.5 に調製する。このようにして得られる混合物（反応液）を 30℃ で 4 時間攪拌することにより反応を行う。反応終了後、反応液に酢酸エチル 25 ml を注加攪拌し、次いで遠心分離することにより有機層及び水層を別々に回収する。回収される水層に再度酢酸エチル 25 ml を加えて同様な操作を行う。このようにして得られる有機層を合一濃縮した後、これをクロロホルム 30 ml に溶解し、無水 Na₂SO₄ を用いて乾燥する。乾燥後、クロロホルムを留去することにより残渣を得る。得られる残渣に、3-ヒドロキシシクロヘキサノンが含まれていることを液体クロマトグラフィー又はガスクロマトグラフィー、および旋光度測定を用いて定性及び／又は定量分析することにより確認する。

【0063】

【発明の効果】

本発明により、3-ヒドロキシシクロヘキサノンを効率的又は簡便に製造することができる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号 5

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

配列番号 6

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

配列番号 7

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

配列番号 8

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

【0064】

【配列表】

<110> Sumitomo Chemical Co., Ltd

<120> Method for producing 3-hydroxycyclohexanon

<130> P154630

<160> 8

<210> 1

<211> 385

<212> PRT

<213> *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

<400> 1

Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr 16

1 5 10 15

Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val 32

20 25 30

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro 48

35 40 45

Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly 64

50 55 60

Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile 80

65 70 75 80

Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp 96

	85		90		95	
His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu						112
	100		105		110	
Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe						128
	115		120		125	
Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp						144
	130		135		140	
Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His						160
	145		150		155	160
Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val						176
	165		170		175	
Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg						192
	180		185		190	
His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys						208
	195		200		205	
Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp						224
	210		215		220	
Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala						240
	225		230		235	240

Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala 256
245 250 255

Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly 272
260 265 270

Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu 288
275 280 285

Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu 304
290 295 300

Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Gly Gly Gly Asp 320
305 310 315 320

Leu Gln Ser Arg Gln Arg Cys Arg Ser Val Ser Thr Thr Gly Cys Arg 336
325 330 335

Asn Ala Gln Arg Pro Cys Gly Cys Gly Pro Trp Ser Val Val Pro Thr 352
340 345 350

Ala Val Glu Arg Gln Arg Lys Asn Thr Asp Ala Arg Pro Asn Ser Ile 368
355 360 365

Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Asn Ser Val Cys Ala Ser Cys Thr Pro 384
370 375 380

Arg 385
385

<210> 2

<211> 1158

<212> DNA

<213> *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1158)

<400> 2

atg aag gcg atc cag tac acg cga atc ggc gcg gaa ccc gaa ctc acg 48

Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr

1

5

10

15

gag att ccc aaa ccc gag ccc ggt cca ggt gaa gtg ctc ctg gaa gtc 96

Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val

20

25

30

acc gct gct ggc gtc tgc cac tcg gac gac ttc atc atg agc ctg ccc 144

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro

35

40

45

gaa gag cag tac acc tac ggc ctt ccg ctc acg ctc ggc cac gaa ggc 192

Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly

50

55

60

gca ggc aag gtc gcc gcc gtc ggc gag ggt gtc gaa ggt ctc gac atc 240

Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile

65	70	75	80	
gga acc aat gtc gtc gtc tac ggg cct tgg ggt tgc ggc aac tgt tgg				288
Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp				
	85	90	95	
cac tgc tca caa gga ctc gag aac tat tgc tct cgc gcc caa gaa ctc				336
His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu				
	100	105	110	
gga atc aat cct ccc ggt ctc ggt gca ccc ggc gcg ttg gcc gag ttc				384
Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe				
	115	120	125	
atg atc gtc gat tct cct cgc cac ctt gtc ccg atc ggt gac ctc gac				432
Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp				
	130	135	140	
ccg gtc aag acg gtg ccg ctg acc gac gcc ggt ctg acg ccg tat cac				480
Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His				
	145	150	155	160
gcg atc aag cgt tct ctg ccg aaa ctt cgc gga ggc tcg tac gcg gtt				528
Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val				
	165	170	175	
gtc att ggt acc ggc ggt ctc ggc cac gtc gct att cag ctc ctc cgc				576
Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg				
	180	185	190	

cac ctc tcg gcg gca acg gtc atc gct ttg gac gtg agc gcg gac aag 624

His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys

195

200

205

ctc gaa ctg gca acc aag gta ggc gct cac gaa gtg gtt ctg tcc gac 672

Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp

210

215

220

aag gac gcg gcc gag aac gtc cgc aag atc act gga agt caa ggc gcc 720

Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala

225

230

235

240

gca ttg gtt ctc gac ttc gtc ggc tac cag ccc acc atc gac acc gcg 768

Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala

245

250

255

atg gct gtc gcc ggc gtc gga tca gac gtc acg atc gtc ggg atc ggg 816

Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly

260

265

270

gac ggc cag gcc cac gcc aaa gtc ggg ttc ttc caa agt cct tac gag 864

Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu

275

280

285

gct tcg gtg aca gtt ccg tat tgg ggt gcc cgc aac gag ttg atc gaa 912

Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu

290

295

300

ttg atc gac ctc gcc cac gcc ggc atc ttc gac atc ggc ggt gga gac 960

Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Gly Gly Gly Asp

305

310

315

320

ctt cag tct cga caa cgg tgc cga agc gta tcg acg act ggc tgc cgg 1008

Leu Gln Ser Arg Gln Arg Cys Arg Ser Val Ser Thr Thr Gly Cys Arg

325

330

335

aac gct cag cgg ccg tgc ggt tgt ggt ccc tgg tct gta gta ccg aca 1056

Asn Ala Gln Arg Pro Cys Gly Cys Gly Pro Trp Ser Val Val Pro Thr

340

345

350

gcg gta gaa cga cag cgg aaa aac act gat gcc cgg ccg aat tcg att 1104

Ala Val Glu Arg Gln Arg Lys Asn Thr Asp Ala Arg Pro Asn Ser Ile

355

360

365

cgg ccg ggc atc agt gtc aga aat tcg gtg tgc gct agc tgc acg cct 1152

Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Asn Ser Val Cys Ala Ser Cys Thr Pro

370

375

380

cga tga

1158

Arg

385

<210> 3

<211> 325

<212> PRT

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 3

Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro 16

1 5 10 15

Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr 32

20 25 30

Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp 48

35 40 45

Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg 64

50 55 60

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val 80

65 70 75 80

Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp 96

85 90 95

Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met 112

100 105 110

Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu 128

115 120 125

Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr 144

130 135 140

Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp 160

145	150	155	160	
Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu				176
	165	170	175	
Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile				192
	180	185	190	
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe				208
	195	200	205	
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn				224
	210	215	220	
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn				240
	225	230	235	240
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala				256
	245	250	255	
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro				272
	260	265	270	
Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp				288
	275	280	285	
Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val				304
	290	295	300	

Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala 320
305 310 315 320

Lys Asn Leu Ser Ala 325
325

<210> 4

<211> 978

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(978)

<400> 4

atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct 48
Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro
1 5 10 15

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc 96
Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr
20 25 30

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac 144
Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp
35 40 45

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt 192

Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg

50

55

60

gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc 240

Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val

65

70

75

80

tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg 288

Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp

85

90

95

tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg 336

Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met

100

105

110

ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gag aag aat ggc cag ggt gag 384

Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu

115

120

125

ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc 432

Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr

130

135

140

gag aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gag aag att tat gag gat 480

Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp

145

150

155

160

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt 528

Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu

165

170

175

gag aag atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc 576

Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile

180

185

190

gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc 624

Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe

195

200

205

tcc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tgc cag aac 672

Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn

210

215

220

cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac 720

Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn

225

230

235

240

gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc 768

Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala

245

250

255

tgg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc 816

Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro

260

265

270

aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac 864

Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp

275

280

285

ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc 912

Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val

290

295

300

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc 960

Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala

305

310

315

320

aag aac ctg tct gcg tga

978

Lys Asn Leu Ser Ala

325

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

gccatggcta gaaggcgatc agtac

25

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Designed oligonucleotide primer for PCR*

<400> 6

cggatccgtc atcgaggcgt gcagctagc

29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Designed oligonucleotide primer for PCR*

<400> 7

gccatggcta tgtctaacgg aaagact

27

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Designed oligonucleotide primer for PCR*

<400> 8

cggatccgtt ataatttcgt agagattca

29

特2002-205207

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

3-ヒドロキシシクロヘキサノンを製造する方法を提供すること。

【解決手段】

(1) 3-ヒドロキシシクロヘキサノンの製造方法であって、1, 3-シクロヘキサンジオンを、1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した3-ヒドロキシシクロヘキサノンを採取する工程を有することを特徴とする製造方法、(2) 3-ヒドロキシシクロヘキサノンが光学活性な3-ヒドロキシシクロヘキサノンであることを特徴とする前記の製造方法、及び、(3) 1, 3-シクロヘキサンジオンを還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が、前記能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞であることを特徴とする前記の製造方法等が提供可能になった。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社